

GYULLADÁSOS FOLYAMATOK VIZSGÁLATA ENDOTÉLSEJTEKEN

Doktori Tézisek

Makó Veronika

Semmelweis Egyetem
Molekuláris Orvostudományok Doktori Iskola



Témavezető: Dr. Prohászka Zoltán, az MTA doktora

Hivatalos bírálók: Dr. Hamar Péter egyetemi adjunktus, PhD

Dr. Krizbai István tudományos főmunkatárs, PhD

Szigorlati Bizottság elnöke: Dr. Oláh Imre egyetemi tanár, az MTA doktora

Szigorlati Bizottság tagjai: Dr. Pállinger Éva tudományos főmunkatárs, PhD

Dr. Réz Gábor egyetemi docens, PhD

Budapest
2011.

1. BEVEZETÉS

Az endotélsejtek barriert képeznek a vér és a szövetek között, strukturálisan és funkcionálisan is nagymértékű heterogenitást mutatnak, számos fiziológiás és patológiás folyamat szabályozásában részt vesznek. Funkciójukat tekintve igen sokoldalúak, szabályozzák az érfal tónusát, biztosítják a vérben oldott tápanyagok felvételét a szövetek számára; antikoaguláns, tromboerezisztens felszín képeznek, számos vazoaktív hormont aktiválnak/inaktiválnak, illetve kapcsolatot teremtenek fehérvérsejtekkel, közvetítve azok migrációját a szövetekbe.

A gyulladás a szervezet egyik fontos védőmechanizmusa, amelyben az endotélsejteknek és a leukocitáknak alapvető szerepe van. Az endotélsejtek lipopoliszacharidra (LPS) és gyulladásos citokinekre – mint például az interleukin-1 β (IL-1 β) és a tumor nekrosis faktor- α (TNF α) – érzékenyen reagálnak. Ezen faktorok hatására gyulladásos jelátviteli útvonalak indulnak be (pl. NF κ B, MAPK), ezáltal számos adhézis molekula expressziója fokozódik, így lehetővé teszik a leukociták sérülés, illetve fertőzés helyére történő vándorlását. Továbbá maguk is képesek proinflammatorikus citokinek és kemokinek termelésére, így elősegítve a további gyulladásos folyamatot.

Az LPS, a TNF α és az IL-1 β a legtöbbet vizsgált gyulladásos faktorok endotélsejtek esetében, amelyek hatásaikban és főbb jelátviteli útvonalaikban nagyon hasonlóak, mégsem tekinthetünk

rájuk úgy, mint felcserélhető faktorokra. Génexpressziós vizsgálatok kimutatták, hogy egyes géneket eltérő mértékben és kinetikával aktiválnak. Jelátviteli útvonalak eltérései okozhatnak génexpressziós különbségeket, azonban eddig nem készült átfogó, több gyulladássos útvonalra kiterjedő összehasonlító vizsgálat.

Az endotélsejtek kapcsolatba lépnek a koagulációs, a kinin-kallikrein és a komplementrendszer különböző elemeivel, és ezek az interakciók az endotélium aktivitását nagymértékben befolyásolják. Továbbá a komplement aktivációkor felszabaduló molekulák hatással lehetnek az endotélsejtek gyulladásban és a véralvadásban betöltött funkcióira is.

A komplement rendszer lektin útvonalának fontos elemei az MBL-asszociált szerint proteázok (MASP), amelyek mannoz kötő fehérjékhez (MBL) és fikolinokhoz kötődve fordulnak elő. A mintázatfelismerő molekulák patogének szénhidrát felszínéhez kötve aktiválják a hozzájuk kötődő, addig inaktív állapotú MASP-okat. A MASP-ok homológiát mutatnak a komplementrendszer klasszikus útjának C1r és C1s proteázaival, vagyis doménszerkezetük megegyezik.

Eddig 3 különböző MASP ismert, a MASP-1, a MASP-2 és a legutóbb felfedezett MASP-3. A MASP-2 funkciója a legismertebb; a lektin útvonal enzime, nagy affinitással hasítani képes a C4 és a C2 fehérjét is. Annak ellenére, hogy a MASP-1 jóval nagyobb mennyiségben van jelen a szérumban, mint a MASP-2 (70nM vs. 5nM), szubsztrátspecifitása és biológiai funkciója mindmáig

vitatott.

A MASP-1 trombin-szerű szubsztrátspecifitással rendelkezik, és hasítani képes a fibrinogént és a XIII-as faktort. Ezek a tulajdonságai gátolhatóak bizonyos trombin gátlókkal (pl. anti-trombin III-mal heparin jelenlétében). C1-inhibitorral gátolható az aktivitása, abban viszont eltér a trombintól, hogy hirudinnal nem.

2. CÉLKITŰZÉS

Munkám során célom volt, hogy az endotélsejtek gyulladásos válaszait komplex, összehasonlítható módon vizsgáljam ismert gyulladásos faktorok hatására. Az így kapott eredményekből egy olyan aktivációs mintázat rajzolható fel, amely segítségével eddig még kevésbé ismert molekulák gyulladásban betöltött szerepére is következtethetünk.

Ennek tükrében az alábbi kérdésekre kerestem a választ:

- Milyen mértékben és milyen kinetikával aktiválja az LPS, a $\text{TNF}\alpha$ és az $\text{IL-1}\beta$ a különböző gyulladásos útvonalakat? Milyen eltéréseket találunk az $\text{NF}\kappa\text{B}$, a p38 és a JNK szignalizációra kifejtett hatásukban HUVEC sejteken?
- Milyen okai lehetnek az esetleges különbségeknek?
- A jelátviteli útvonalakon tapasztalt különbségek megmutatkoznak fehérje szinten? Milyen mértékben aktiválja a három gyulladásos faktor az E-szelektin és az ICAM-1 adhéziós molekulák expresszióját? Különbözik az IL-6, az IL-8 és az MCP-1 citokinek termelésére kifejtett hatásuk?

A fenti kérdésekre válaszolva kirajzolódik egy aktivációs mintázat, amely összeveti a három gyulladásos faktor 10 paraméterre kifejtett hatását.

Munkám első felében három jól ismert gyulladásos faktorról dolgoztam, míg a második részében egy eddig nagyrészt ismeretlen funkciójú szerin proteáz, a MASP-1 endotélsejtekre kifejtett hatására voltam kíváncsi. A MASP-1 hasítani képes trombin-szubsztrátokat, valamint ismert, hogy a trombin több intracelluláris jelátviteli útvonalat is beindít endotélsejteken, így az alábbi kérdések mentén haladva dolgoztam:

- A trombinhoz hasonlóan a MASP-1 is kivált Ca^{2+} -választ?
- Milyen egyéb jelátviteli útvonalakat aktivál? Aktiválja az NF κ B és a p38 MAPK útvonalakat?
- A jelátviteli útvonalak ismeretében fehérje szinten mire van hatással a MASP-1? Fokozza fontos adhéziós molekulák expresszióját és citokinek termelődését?
- A fentiek ismeretében tekinthető a MASP-1 gyulladásos faktornak?

3. MÓDSZEREK

Humán köldökzsínór véna endotélsejt (HUVEC) kultúrán dolgoztunk kísérleteinkben. Az endotélsejteket kollagenázzal izoláltuk friss köldökzsínórból, majd 2-3 passzálást követően használtuk fel őket.

Az **NFκB nukleáris transzlokációját** Olympus IX-81 inverz fluoreszcens mikroszkóppal vizsgáltuk. A képeket alysis 3.2 szoftver segítségével értékeltük ki.

A **p38, a JNK és az Akt útvonalak foszforilációját** Western blottal határoztuk meg. A membránok denzitometriás kiértékelését Syngene GeneTools szoftver segítségével végeztük.

Intracelluláris Ca^{2+} -szint változását fluoreszcens mikroszkóppal mértük. A Fluo-4-AM-mel feltöltött sejtekben 10 másodpercenként detektáltuk a fluoreszcencia változást, majd az első képhez viszonyítva állapítottuk meg a relatív fluoreszcencia intenzitást.

A **TLR4 lokalizációját és az LPS internalizációjának kinetikáját** fluoreszcens mikroszkóppal vizsgáltuk. A TLR4 kolokalizációs vizsgálatait Olympus Fluoview 500 konfokális mikroszkópon végeztük. A Pearson-féle kolokalizációs koefficiens (CI) az ImageJ 1.34i szoftver Image Correlator Plus kiegészítőjével számoltuk ki.

Az **adhéziós molekulák expresszióját** sejtes ELISA módszerrel határoztuk meg, E-szelektin esetében kezelés után 4, ICAM-1 esetén 24 órával.

A **citokinek termelését** szendvics ELISA módszerrel, 24 órás kezelést követően, a felülúszóból mértük.

Az eredményeket GraphPad Prism 4.02 (www.graphpad.com) szoftver segítségével elemeztük és ábráztuk.

4. EREDMÉNYEK

4.1. LPS, TNF α és IL-1 β gyulladásos faktorok hatásának összehasonlítása

Az NF κ B transzlokáció kinetikája

Elsőként meghatároztuk, hogy mi az legkisebb LPS, a TNF α és az IL-1 β koncentráció, ami már maximális NF κ B transzlokáció vált ki, majd a kinetikai mérések során ezeket a koncentrációkat alkalmaztuk. Így 1 μ g/ml LPS-sel, 10 ng/ml TNF α -val és 1 ng/ml IL-1 β -val kezeltük a sejteket 3,75, 7,5, 15, 30, 60, 120 vagy 240 percig. Az LPS csak 30 perc után váltott ki szignifikáns NF κ B transzlokációt és 120 perc körül fejtette ki maximális hatását. A TNF α és az IL-1 β már 7,5 perc elteltével is okozott nukleáris transzlokációt, és maximális hatását mindkét faktor 30 perc körül érte el. Továbbá az LPS a TNF α -hoz és az IL-1 β -hoz képest is sokkal kisebb mértékű NF κ B transzlokációt okozott.

A p38, a JNK és az Akt foszforilációjának kinetikája

A sejteket 10, 30, 60 és 120 percig kezeltük 1 μ g/ml LPS-el, 10 ng/ml TNF α -val és 1 ng/ml IL-1 β -val. A p38 és a JNK útvonalak esetén az LPS a maximális hatását csak 60 perc után érte el, és ez a hatás 120 perc elteltével kezd lecsengeni. Ezzel szemben a két inflammatorikus citokin maximális hatása már korábban - TNF α esetében 10 perc, míg IL-1 β esetében 30 perc után - észlelhető volt.

A kinetikai eltéréseken túl itt is tapasztaltunk különbséget a három faktor által kiváltott maximális hatás erősségében. A MAPK és az NFκB útvonalaktól eltérően, mind a három faktor csak gyenge Akt foszforilációt okozott, és időbeli eltérést sem tapasztaltunk.

Ca²⁺-szignál gyulladásos faktorok hatására

Egyik gyulladásos faktor hatására sem változott meg az intracelluláris Ca²⁺-szint, míg a pozitív kontrollként használt trombin és bradikinin erőteljes Ca²⁺-választ váltott ki.

TLR4 lokalizációja endotélsejtekben

A TLR4 intracelluláris lokalizációt mutat HUVEC sejtekben, előfordulása főként a mag körüli régióra korlátozódik. Annak érdekében, hogy jobban behatároljuk, hogy mi az az intracelluláris kompartment, amiben a TLR4 lokalizálódik, konfokális mikroszkóppal megvizsgáltuk a TLR4 kolokalizációját a Golgi apparátussal. Golgi markerként BODIPY-FL C5 Ceramidot használtunk, és kísérleteinkben a TLR4 erős kolokalizációt mutatott a Golgi komplexszel.

LPS internalizációjának vizsgálata

A sejteket 2, 10, 30 illetve 60 percre inkubáltuk biotinilált LPS-sel, majd Alexa488 konjugált streptavidinnel, ezután vizsgáltuk az LPS lokalizációját és a sejtmembránnal való kolokalizációját. Két perc elteltével az LPS diffúz festődést mutatott a sejtmembránban és kolokalizált a PECAM-1 membránfehérjével. 10 perc után ez a kolokalizáció jelentős mértékben lecsökkent. 30 illetve 60 perc

elteltével az LPS szinte teljesen internalizálódott, főként a mag körüli régióban lokalizálódott.

Adhéziós molekulák és citokinek expressziója

Az E-szelektin és az ICAM-1 adhéziós molekulák, valamint az IL-6, az IL-8 és az MCP-1 citokinek dóziszfüggő expresszióját határoztuk meg. Az LPS az E-szelektin expresszióját kisebb mértékben növelte meg, mint a TNF α és az IL-1 β . Ezzel szemben az ICAM-1 expressziója mind a három faktor hatására egyforma mértékben emelkedett. Az IL-6 és az IL-8 termelése IL-1 β hatására növekedett legnagyobb mértékben, ehhez képest az LPS kisebb mértékű aktivációt okozott, míg TNF α hatására csak minimális citokinszekréciót figyelhattunk meg. A másik két citokintől eltérően, az MCP-1 szekrécióját mind a három gyulladásos faktor egyformán nagymértékben növelte meg.

4.2. MASP-1 hatása endotélsejtekre

MASP-1 által kiváltott Ca²⁺-válasz

A MASP-1 dóziszfüggő módon szignifikáns Ca²⁺-választ váltott ki. A MASP-1 által kiváltott Ca²⁺-szignál kinetikája hasonló volt, mint a pozitív kontrollként használt trombiné, ugyanakkor MASP-1 hatására szisztematikusan kisebb Ca²⁺-jelet tapasztaltunk a trombin jeléhez képest. A MASP-2 – ami a MASP-1-gyel nagymértékű strukturális homológiát mutat – még nagyon magas koncentrációban sem indukált intracelluláris Ca²⁺-szint változást.

NFκB és p38 MAPK útvonalak aktivációja

Kíváncsiak voltunk, hogy vajon a MASP-1 részt vesz-e különböző proinflammatorikus útvonalak aktivációjában. Egy órás MASP-1 kezelés dóziszfüggő NFκB nukleáris transzlokációt váltott ki, bár a maximális hatása jóval kisebb mértékű volt az LPS-hez viszonyítva. A p38 MAPK aktivációját 30 perces kezelést követően vizsgáltuk, és azt tapasztaltuk, hogy a MASP-1 erős, dóziszfüggő p38 foszforilációt vált ki.

Adhéziós molekulák és citokinek expressziójára

Az E-szelektin, az IL-6 és az IL-8 termelését fokozta a MASP-1 (860 nM), de kisebb mértékben, mint az LPS (1 µg/ml), és az IL-1β (1ng/ml), azonban az IL-6 és az IL-8 termelést nagyobb mértékben indukálta, mint a TNFα (10ng/ml). Az MCP-1 szekréciójára a MASP-1 nem volt hatással.

5. KÖVETKEZTETÉSEK

A gyulladásos faktorok hatását egyidejűleg, a paramétereket azonos körülmények között vizsgáltuk, ezáltal a kapott eredmények jobban összevethetőek egymással. Összefoglalva ezeket felvázoltunk egy olyan aktivációs mintázatot, amely összehasonlító módon ábrázolja a gyulladásos faktorok hatását a 10 vizsgált paraméterre.

- Az LPS lassabban és kisebb intenzitással aktiválja az NF κ B, a p38 és a JNK útvonalakat, mint a TNF α és az IL-1 β . Az LPS késleltetett szignalizációjának az egyik oka az lehet, hogy a jelátvivő receptora, a TLR4 nem található meg az endotélsejtek felszínén, hanem intracellulárisan, a Golgiban lokalizálódik. Az LPS felvételének kinetikája receptor-mediált internalizációra hasonlít, tehát valószínűleg létezik az LPS-nek egy másik, sejtfelszíni receptora is.
- Az Akt és a Ca-szignalizáció sem játszik szerepet az NF κ B és a MAPK útvonalakon tapasztalt különbségekben.
- A három gyulladásos faktor eltérő mértékben növeli meg az endotélsejtek E-szelektin expresszióját, illetve IL-6 és IL-8 termelését, viszont az ICAM-1 és az MCP-1 kifejeződésére ugyanolyan mértékben hatnak. Az E-szelektin expresszióját az LPS fokozta legkisebb mértékben, az IL-6 és az IL-8 termelésre pedig a TNF α volt minimális hatással.

	IL-1 β	TNF α	LPS
NF κ B			
P38 MAPK			
JNK			
Akt			

	IL-1 β	TNF α	LPS	MASP-1
NF κ B				
p38 MAPK				
JNK				N.A.
Akt				N.A.
Ca-szignál				
E-szelektin				
ICAM-1				N.A.
IL-6				
IL-8				
MCP-1				

1. ábra. Gyulladásos faktorok aktivációs mintázata

(A): Jelátviteli útvonalak kinetikájának összehasonlítása. Vörös: az adott faktor maximális hatása 15 percen belül jelentkezett; narancssárga: a maximális hatását kb. 30 perc után érte el; citromsárga: a maximális hatást 60 perc után vagy még később észleltük.

(B) Gyulladásos faktorok által kiváltott maximális hatások összehasonlítása paraméterenként két-szemponos ANOVA-val. Vörös: minden sorban a legerősebb aktivátor; Narancssárga: szignifikánsan gyengébb hatású, mint a legerősebb; Citromsárga: második legerősebbnél szignifikánsan gyengébb aktivátor. Fehér: nincs aktiváció; Szürke, N.A.: Nincs adat. Ahol a faktorok egyforma mértékű aktivációt okoztak (Akt, ICAM-1, MCP-1), ott irodalmi adatokra támaszkodva döntöttük el, hogy az adott aktiváció milyen erősnek tekinthető.

- A vizsgált jelátviteli útvonalakra, adhéziós molekulákra és citokinekre kifejtett hatások alapján kirajzolódik egy aktivációs mintázat, amely alapján a különböző gyulladásos faktorok jobban összevethetőek. Az aktivációs mintázatból a fellépő gyulladás típusára is következtethetünk. Például IL-1 β jelenlétekor a magas E-szelektin és IL-8 termelésnek köszönhetően valószínűleg fokozottabb mértékű neutrofil granulocita toborzás figyelhető meg, mint LPS vagy TNF α esetén.

A jól ismert gyulladásos faktorokkal ellentétben a MASP-1 hatását eddig egyáltalán nem vizsgálták endotélsejteken. A MASP-1 eredményeink szerint proinflammatorikus irányba tolja az endotélsejteket, ezáltal egy újabb kapcsolódási pontot jelent a véralvadás, a komplementrendszer és a gyulladásos folyamatok között.

- A MASP-1 dózisfüggő Ca-választ vált ki endotélsejtekben, a trombinéhoz hasonló kinetikával. Ezzel szemben a MASP-2 még nagyon magas koncentrációban sem okozott Ca²⁺-szint emelkedést a sejtekben.
- A MASP-1 aktiválja az NF κ B és a p38 MAPK útvonalakat. Ezen kívül megnöveli a sejtek E-szelektin expresszióját, és fokozza az IL-6 és IL-8 termelését. Így hatásai alapján a MASP-1 könnyen

beilleszthető az ismert gyulladásos faktorok által létrehozott aktivációs mintázat mellé.

- Tehát a MASP-1 gyulladásos fenotípus irányába tolja az endotélsejteket. Ennek következtében – a többi gyulladást kiváltó molekula (pl. trombin, LPS) hatásához hasonlóan – megnőhet a permeabilitás, valamint a leukociták adhézioja és transzmigrációja, fokozódhat a trombus képződés és az extracelluláris mátrix átrendeződése is megkezdődhet.

6. SAJÁT PUBLIKÁCIÓK JEGYZÉKE

Disszertáció alapjául szolgáló publikációk

1. Makó V, Czúcz J, Weiszhár Z, Herczenik E, Matkó J, Prohászka Z, Cervenak L. Proinflammatory activation pattern of human umbilical vein endothelial cells induced by IL-1 β , TNF- α , and LPS. *Cytometry A*. 2010 Oct;77(10):962-70.

IF: 3,032

2. Megyeri M*, Makó V*, Beinrohr L, Doleschall Z, Prohászka Z, Cervenak L, Závodszy P, Gál P. Complement protease MASP-1 activates human endothelial cells: PAR4 activation is a link between complement and endothelial function.

J Immunol. 2009 Sep 1;183(5):3409-16.

IF: 5,646

*Megosztott elsőszervezős

Disszertáció témájához kapcsolódó publikációk

1. Kiszél P, Makó V, Prohászka Z, Cervenak L. Interleukin-6 -174 promoter polymorphism does not influence IL-6 production after LPS and IL-1 beta stimulation in human umbilical cord vein endothelial cells.

Cytokine. 2007 Oct;40(1):17-22.

IF: 2,169

2. Keltai K, Cervenak L, Makó V, Doleschall Z, Zsáry A, Karádi I. Doxorubicin selectively suppresses mRNA expression and production of endothelin-1 in endothelial cells.

Vascul Pharmacol. 2010 Nov-Dec;53(5-6):209-14.

IF: 2,044

Disszertációtól független publikációk

1. Stenczer B, Rigó J Jr, Prohászka Z, Derzsy Z, Lázár L, Makó V, Cervenak L, Balogh K, Mézes M, Karádi I, Molvarec A. Plasma osteopontin concentrations in preeclampsia - is there an association with endothelial injury? *Clin Chem Lab Med*. 2010 Feb;48(2):181-7.

IF: 1,886

2. Lazar L, Rigó J Jr, Nagy B, Balogh K, Makó V, Cervenak L, Mézes M, Prohászka Z, Molvarec A. Relationship of circulating cell-free DNA levels to cell-free fetal DNA levels, clinical characteristics and laboratory parameters in preeclampsia. *BMC Med Genet*. 2009 Nov 21;10:120.

IF: 2,84

3. Gombos T, Makó V, Cervenak L, Papassotiriou J, Kunde J, Hársfalvi J, Föhrécz Z, Pozsonyi Z, Borgulya G, Jánoskúti L, Prohászka Z. Levels of von Willebrand factor antigen and von Willebrand factor cleaving protease (ADAMTS13) activity predict clinical events in chronic heart failure. *Thromb Haemost*. 2009 Sep;102(3):573-80.

IF: 4,451

4. Molvarec A, Derzsy Z, Kocsis J, Bóze T, Nagy B, Balogh K, Makó V, Cervenak L, Mézes M, Karádi I, Prohászka Z, Rigó J Jr. Circulating anti-heat-shock-protein antibodies in normal pregnancy and preeclampsia. *Cell Stress Chaperones*. 2009 Feb 11.

IF: 2,167

5. Herczenik E, Varga Z, Eros D, Makó V, Oroszlán M, Rugonfalvi-Kiss S, Romics L, Füst G, Kéri G, Orfi L, Cervenak L. Protein kinase inhibitor-induced endothelial cell cytotoxicity and its

prediction based on calculated molecular descriptors. *J Recept Signal Transduct Res.* 2009;29(2):75-83. **IF: 1,517**

6. Molvarec A, Rigó J Jr, Böze T, Derzsy Z, Cervenak L, Makó V, Gombos T, Udvardy ML, Hársfalvi J, Prohászka Z. Increased plasma von Willebrand factor antigen levels but normal von Willebrand factor cleaving protease (ADAMTS13) activity in preeclampsia. *Thromb Haemost.* 2009 Feb;101(2):305-11. **IF: 4,451**

7. Molvarec A, Rigó J Jr, Lázár L, Balogh K, Makó V, Cervenak L, Mézes M, Prohászka Z. Increased serum heat-shock protein 70 levels reflect systemic inflammation, oxidative stress and hepatocellular injury in preeclampsia. *Cell Stress Chaperones.* 2009 Mar;14(2):151 **IF: 2,16**

KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Köszönöm Dr. Cervenak Lászlónak, hogy az általa vezetett endotél munkacsoportban dolgozhattam, és tudományos diákköri munkámtól kezdve folyamatosan támogatott szakmailag és emberileg egyaránt. Mindig türelemmel, lelkesedéssel és hasznos ötletekkel segítette munkámat. Köszönöm az endotél munkacsoport munkatársainak: Dr. Herczenik Eszternek, Mindlerné Weiszhársóknak, Dr. Kiszél Petrának, Czúcz Juditnak, Schaffer Gyulának, Jani Péter Károlynak a közös munkát.

Köszönöm Füst György Professzor Úrnak, hogy lehetővé tette, hogy bekapcsolódjak a kutatólaboratórium munkájába, mindvégig figyelemmel kísérte, és segítette fejlődésemet.

Köszönöm Prohászka Zoltán Professzor Úrnak, hogy témavezetőmként és a labor vezetőjeként biztosította a kutatáshoz szükséges anyagi és szakmai háttérrel, és hasznos kritikáival előrelendítette munkámat. Köszönöm Dr. Szilágyi Ágnesnek a dolgozatom gondos átolvasását.

Köszönet illeti továbbá a kutatólaboratórium összes munkatársát, akik az évek során tanácsaikkal és a jó hangulat megteremtésével segítették munkámat. Végül köszönöm a családomnak és barátaimnak, hogy mellettem álltak és támogattak.